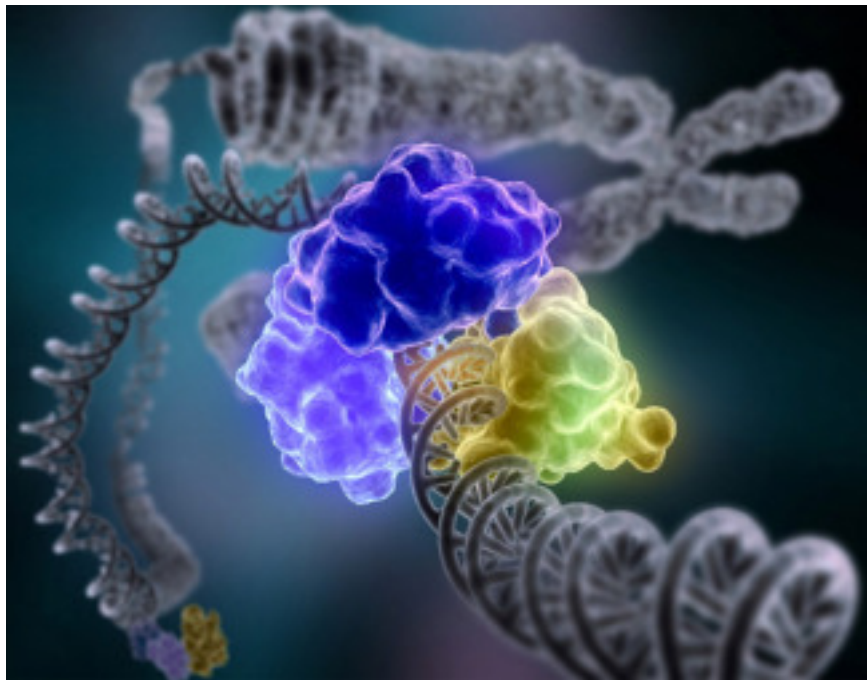


Les lesions del DNA en el micronucli indueixen una resposta al dany localment deficient

04/2010 - Biologia.

Els micronuclis són un dels indicadors més emprats per estudiar la presència d' inestabilitat cromosòmica en humans. Els micronuclis poden contenir cromosomes sencers o fragments cromosòmics derivats d'una reparació anòmla del dany en el DNA. Partint de la relació existent entre la reparació del DNA i la presència de micronuclis, es va decidir estudiar l'habilitat de les lesions de DNA segrestades en els micronuclis per activar una resposta efectiva al dany. Mitjançant tècniques d'immunofluorescència es va poder veure que només una petita part de les lesions del DNA micronuclear reclutaven correctament proteïnes de detecció del dany. D'altra banda també es va demostrar que el DNA micronuclear podia ésser degradat i que aquesta degradació no afectava la proliferació de la cèl·lula. Així doncs, tant l'absència de reparació de les lesions del DNA micronuclear, com la degradació del mateix, es tradueixen en una pèrdua de material genètic que podria afavorir encara més el procés de tumorigènesi.



Acció reparadora de la DNA ligasa I. Imatge: Tom Ellenberger.

La inestabilitat cromosòmica és un estat transitori o persistent caracteritzat per una desmesurada formació d'aberracions cromosòmiques de tipus numèric i/o estructural. Aquesta inestabilitat està molt relacionada amb la tumorigènesi (Jallepalli i col., 2001; Nowak i col., 2002). Aquesta relació rau en els processos de pèrdua i/o amplificació gènica que alteren la dosi de les principals proteïnes oncogèniques. Una de les causes principals de la inestabilitat cromosòmica són els cicles BFB (breakage-fusion-bridge). Aquests cicles s'inicien quan la maquinària de reparació falla en el moment de reparar trencaments de la cadena del DNA i/o davant la presència d'extrems cromosòmics (telòmers) escurçats. Quan això passa, es produeixen fusions cromosòmiques incorrectes que afavoreixen l'aparició d'unes estructures anomenades ponts anafàsics a la divisió cel·lular. Aquests ponts es poden trencar i generar altres trencaments que poden desembocar en la formació de nous ponts. D'aquesta manera la cèl·lula entra en un cicle persistent de fusió-pont-trencament (cicle BFB).

Sovint, els fragments cromosòmics generats pel trencament dels ponts anafàsics s'acaben separant de la resta de material genètic i, al final de la mitosi, formant unes estructures anomenades micronuclis. Degut a la seva relació amb els ponts anafàsics, els micronuclis es consideren un bon indicador d'inestabilitat cromosòmica. Tanmateix, aquesta no és l'única manera de generar micronuclis. Quan les cèl·lules són exposades a radiació ionitzant, es produeixen trencaments en les cadenes del DNA que, si no són reparats, poden generar fragments cromosòmics sense centròmer que donaran lloc a micronuclis.

L'habilitat de les lesions de DNA segrestades en els micronuclis per activar una correcta resposta de dany és un tema una mica controvertit, ja que alguns factors de reparació del DNA han estat detectats en els micronuclis, però d'una manera poc consistent. Per tal d'entendre millor la resposta al dany del DNA micronuclear vàrem analitzar la presència de factors de resposta al dany en el DNA en micronuclis. El treball es va realitzar aplicant tècniques d'immunofluorescència sobre micronuclis induïts per radiació ionitzant en fibroblasts humans normals.

La inducció de trencaments de doble cadena de DNA mitjançant la radiació ionitzant produeix modificacions en les proteïnes estructurals de la cromatina, com és el cas de la histona H2AX que és fosforilada ràpidament en la zona propera a la lesió. Sorprenentment, en els micronuclis vàrem distingir entre dos patrons de marcatge de la histona H2AX fosforilada (#H2AX): un marcatge discret de tipus puntual (Figura 1.a) que indicava la presència de trencaments en el DNA (Rogakou i col., 1998), i un marcatge de tipus uniforme (Figura 1.b) que afectava tota la superfície micronuclear i que apuntava a la degradació del DNA micronuclear (Rogakou i col., 2000). Per tal d'estudiar el reclutament de factors de reparació en els micronuclis amb marcatge d'#H2AX de tipus puntual, vàrem realitzar estudis de co-localització de l'#H2AX amb les proteïnes 53BP1 i MRE11 (p53 binding protein 1 i Meiotic recombination 11).

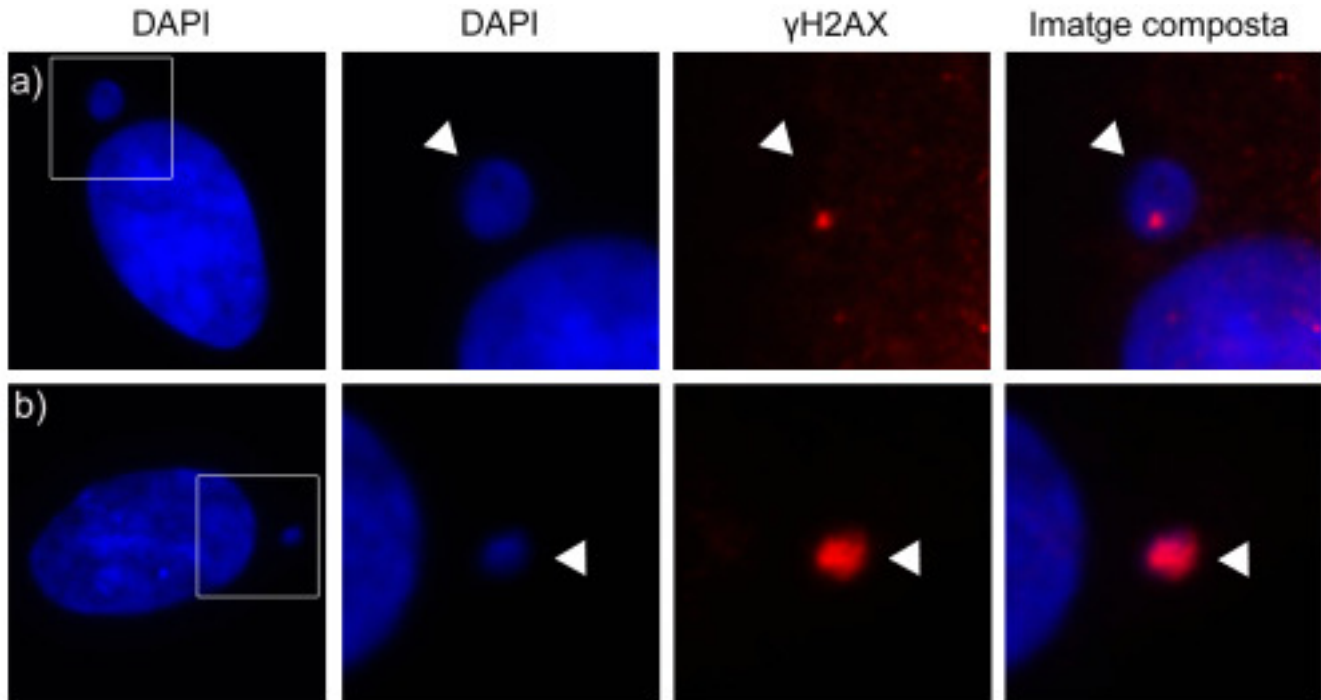


Figura 1. Immunofluorescència de la proteïna H2AX fosforilada (#H2AX). a) Micronuclis amb marcatge #H2AX de tipus puntual, indicant la presència d'un trencament en la cadena de l'ADN. b) Micronuclis marcat uniformement amb #H2AX i, per tant, degradant-se. Les fletxes de color blanc assenyalen el micronucli.

Aquests experiments ens varen permetre veure que, a diferència de les lesions en el DNA nuclear, només una petita fracció de les lesions del DNA micronuclear podien reclutar de manera correcta les proteïnes 53BP1 i MRE11 (figura 2.a i 2.b). Una possible explicació a aquests resultats podria ser un defecte en el tràfic de proteïnes (Hoffelder i col., 2004) a través de l'embolcall micronuclear que comprometaria el reclutament dels factors de reparació a les lesions del DNA que es troben segregades dins els micronuclis.

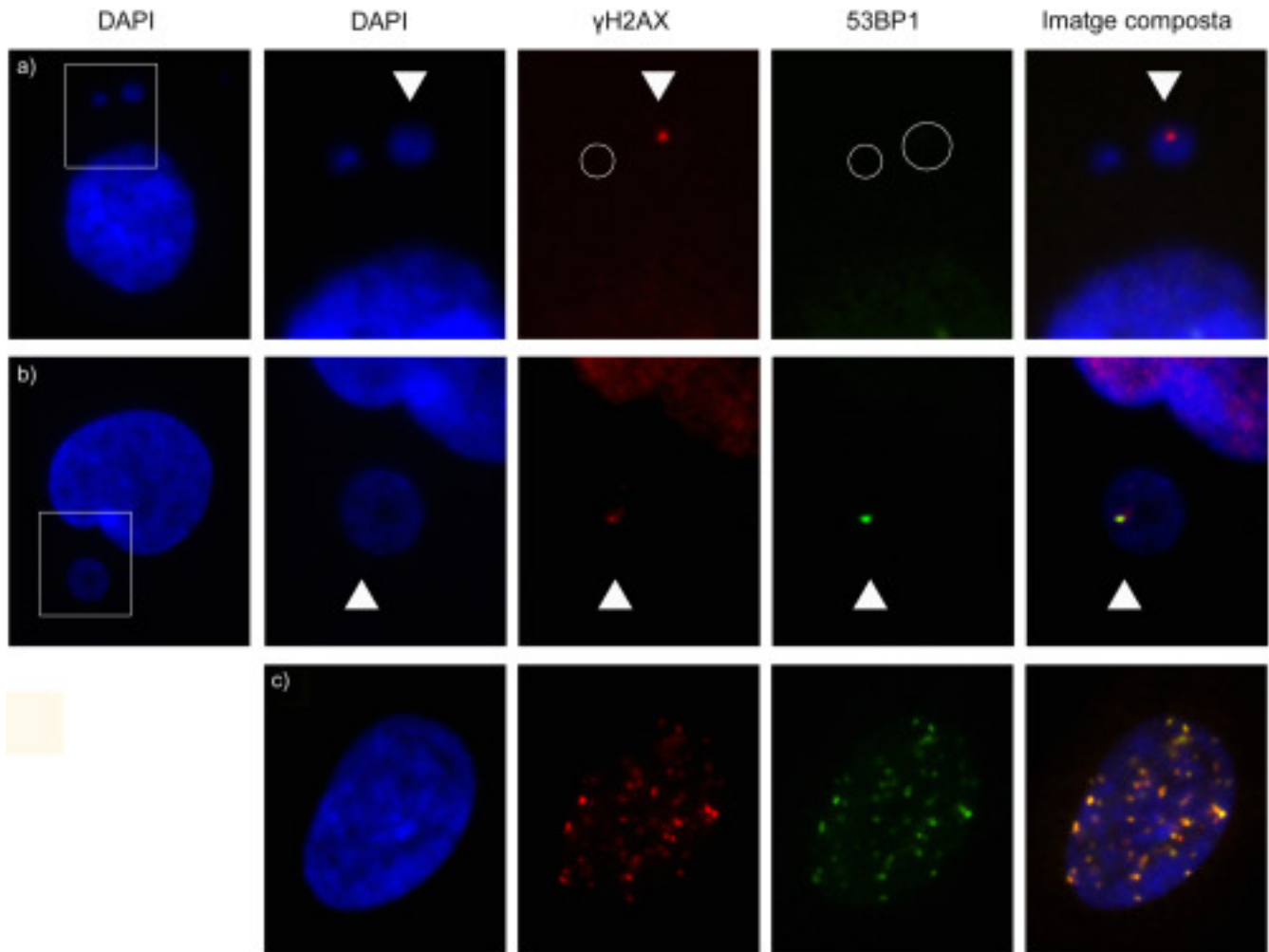


Figura 2. Immunofluorescència de la histona H2AX fosforilada (#H2AX) i el factor de senyalització de dany 53BP1. a) Micronucli amb marcatge de #H2AX de tipus puntual i sense 53BP1. b) Micronucli amb marcatge puntual de #H2AX co-localitzant amb marcatge de 53BP1 i, per tant, senyalitzant la presència d'una trencament en l'ADN micronuclear on s'ha pogut reclutar el factor 53BP1. c) Nucli d'una cèl·lula irradiada on el marcatge puntual de #H2AX co-localitza amb el de 53BP1, indicant que 53BP1 s'ha reclutat als trencaments de manera correcta. Les fletxes de color blanc assenyalen els micronuclis.

D'altra banda, vàrem demostrar que el marcatge de la #H2AX de tipus uniforme en els micronuclis indicava realment la degradació del DNA. Això ho vàrem fer combinant l'assaig de TUNEL amb la immunofluorescència de la #H2AX (Figura 3.b). Una vegada demostrat que els micronuclis realment es podien degradar, ens vàrem preguntar si això afectava la capacitat de la cèl·lula per continuar dividint-se. En aquest sentit, mitjançant altres estudis d'immunofluorescència, vàrem poder observar que la degradació dels micronuclis només afecta lleugerament la proliferació cel·lular.

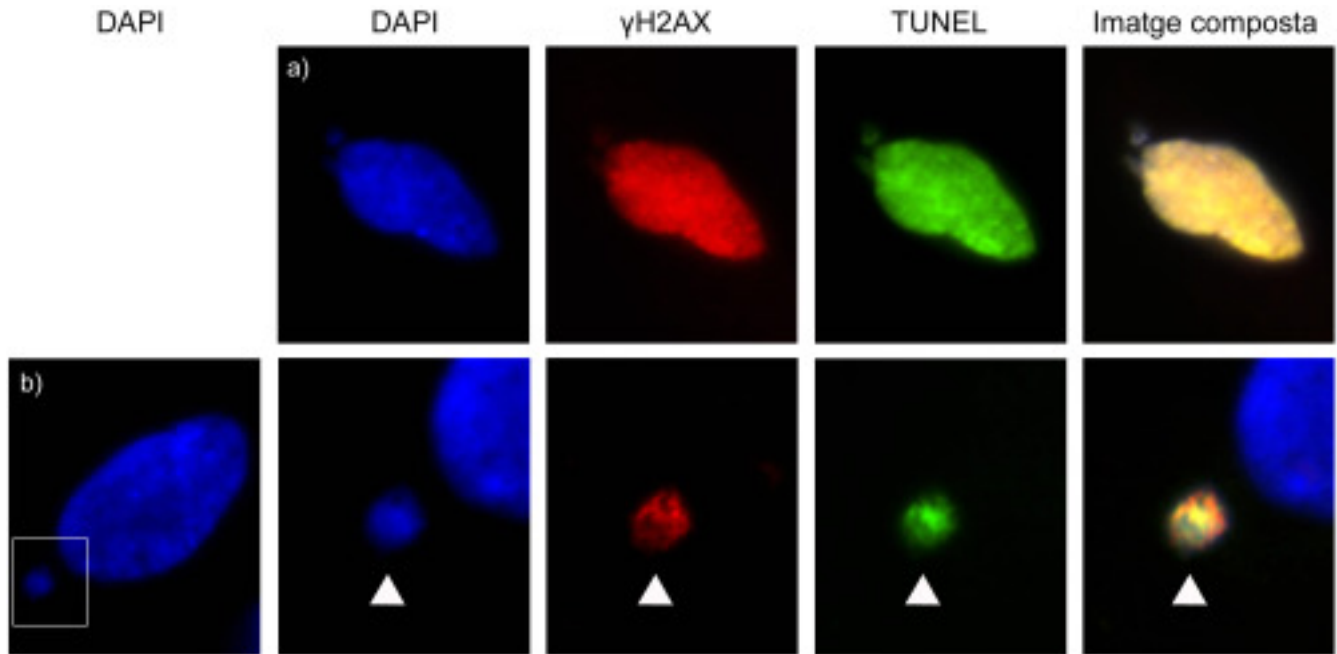


Figura 3. Combinació de la immunofluorescència de la histona fosforilada H2AX (γ H2AX) amb la tècnica de TUNEL. a) Nucli amb marcatge uniforme de γ H2AX que co-localitza amb el senyal de TUNEL, fet que indica que l'ADN nuclear s'està degradant. b) Micronucli marcat uniformement amb γ H2AX i amb TUNEL. Com que el marcatge d'ambdues tècniques co-localitza, podem concloure que l'ADN micronuclear s'està degradant. Les fletxes de color blanc assenyalen el micronucli.

Finalment, també vàrem poder observar que, mentre que a temps curts post-irradiació la major part de micronuclis presentaven un marcatge de la γ H2AX de tipus puntual, a temps llargs post-irradiació, la major part de micronuclis mostraven el marcatge de tipus uniforme. Aquesta tendència, juntament amb els resultats anteriors, podrien indicar que els micronuclis incapaços de reparar les lesions del DNA s'acabarien degradant, sense que això afectés la capacitat de proliferació cel·lular. La pèrdua de material podria afavorir encara més el procés de tumorigènesi en termes de pèrdua de dosi gènica.

Mariona Terradas

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

"DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response". Terradas, Mariona; Martín, Marta; Tusell, Laura; Genesca, Anna. DNA REPAIR, 8 (10): 1225-1234 OCT 2 2009.